

Beseitigung des Störeffektes im Modellversuch

Im Gegensatz zu einigen unbefriedigenden Versuchen mit Anilincitrat (9) gelang die Eliminierung der störenden Substanzen sehr einfach durch kurzes Kochen bei 100°, wobei Acetacetat unter CO_2 -Abspaltung in Aceton übergeht, welches wegen seines niederen Siedepunktes von 56,1° flüchtig ist. Über die dabei nötigen Bedingungen gab folgender Versuch Aufschluß:

Von gepooltem „Normalserum“ („N“) wurden 10,0 ml mit 0,05 ml einer 0,85M Acetacetatlösung versetzt; die Endkonzentration betrug also etwa 4 μMol Acetacetat/ml Serum („NA“). Je 6,0 ml N-Serum und 6,0 ml NA-Serum wurden mit Wolframat enteiweißt, von den Überständen $5 \times 3,0$ ml in Reagenzgläser abpipettiert, je 1 Probe als Ausgangswert beiseite gestellt, die restlichen Gläser in ein kochendes Wasserbad gesetzt und nach genau 1, 2, 5 und 10 Min. je 1 Reagenzglas der N- bzw. NA-Serie in ein Eisbad überführt. In je 0,05 ml der NA-Serie wurde Acetacetat enzymatisch bestimmt, mit dem Rest die Farbreaktion nach BONSNES durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

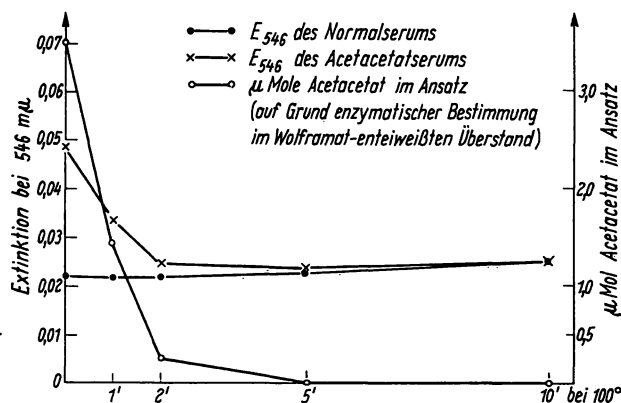


Abb. 2. Modellversuch zur Beseitigung des Ketonkörper-Störeffektes im Ansatz nach BONSNES

Der Versuch zeigt, daß sich durch Kochen bis zu 10 Min. die Extinktionen des Normalserums praktisch nicht verändern, während die durch das Vorhandensein von Acetacetat bedingte zusätzliche Extinktion im NA-Serum innerhalb von 5 Min. völlig beseitigt ist. Entsprechend geht das im enzymatischen Test bestimmte Acetacetat auf nicht mehr nachweisbare Mengen zurück. Die Anwesenheit von β -Hydroxybutyrat in einer Konzentration von 10 $\mu\text{Mol/ml}$ Serum und von Glucose (300, 600 und 900 mg%) hatte keinen Einfluß auf die Beseitigung des Acetacetats in dem angegebenen Versuch.

Diskussion

Die erst kürzlich von POLAR und METCOFF (11) sowie SLOT (12) publizierten Arbeiten zeigen, daß es trotz vieler Bemühungen noch keine befriedigende Bestimmungsmethode für das Kreatinin im Serum gibt. Nach einer von MERTEN in den Jahren 1962 und 1965 durchgeführten Erhebung wird in den von ihm erfaßten Laboratorien das Kreatinin überwiegend nach der Vorschrift von POPPER (2) bestimmt. Unter Berücksichtigung dieser Situation erscheint die in dieser Arbeit angegebene Methode einer Parallelbestimmung des Kreatinins vor und nach Beseitigung des Acetacetats und Acetons durch kurzes Erhitzen als die einfachste Möglichkeit, bei Ketonämie zu verlässlichen Kreatininwerten zu gelangen. Bei einigen bisher in unserer Klinik untersuchten Fällen stimmten die im Stadium der Ketoacidose ermittelten „wahren“ Kreatininwerte sehr gut mit den nach Normalisierung der Ketonkörper erhaltenen Werten überein.

Literatur

1. JAFFE, M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 10, 391 (1886). —
2. POPPER, H., E. MANDEL und H. MAYER, Biochem. Z. 291, 354 (1937). — 3. BONSNES, R. W. und H. H. TAUSKY, J. biol. Chemistry 158, 581 (1945). — 4. BROD, J. und J. H. SIROTA, J. Clin. Invest. 27, 645 (1948). — 5. KREBS, H. A. und L. V. EGGLESTON, Biochem. J. 39, 408 (1945). — 6. WILLIAMSON, D. H., J. MELLANBY und H. A. KREBS, Biochem. J. 82, 90 (1962). — 7. BERGMAYER, H. U. und
8. GARNER, R. J., Nature (London) 170, 460 (1952). — 9. EDSON, N. L., Biochem. J. 29, 2082 (1935) zit. nach Manometric Techniques, Umbreit-Burris-Stauffer, Burgess Publ. Minneapolis (1957). — 10. LORBER, L., Biochem. Z. 181, 375 (1927). — 11. POLAR, E. und J. METCOFF Clin. Chem. (New York) 11, 763 (1965). — 12. SLOT, C., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 17, 381 (1965).

Dr. R. Kattermann, 34 Göttingen, Humboldtallee 1

Akute Veränderungen der Serumproteine bei Ratten nach einmaliger Verabreichung von Barbitol

Von J. NEUBAUR

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Deuticke)

(Eingegangen am 13. Juni 1966)

Rattenserum wurde vor und nach Verabreichung einer einmaligen Dosis Barbitol im Stärkegel mit der Hochspannungselektrophorese getrennt. Danach erfolgte Proteinanalyse der Fraktionen mit dem Folin-Reagenz. Die slow- α_2 -Globulinfraktion war 6–36 Stdn. nach Barbitol-Verabreichung gegenüber den Werten vor Barbitolgabe und den Werten 1–3 Stdn. und denen 48–96 Stdn. nach Barbitol-Verabreichung erhöht. Die Erhöhung ist statistisch gesichert. Als Grund der genannten Veränderungen wird der Einfluß des Barbitols auf den Proteinstoffwechsel der Leber angesehen. Die Vorgänge scheinen für Barbitol nicht spezifisch zu sein.

Rat serum was fractionated by high voltage electrophoresis in starch gel before and after the administration of a single dose of Barbitol. The fractions were then analysed for protein with Folin's reagent. The slow- α_2 -globulin fraction was increased 6–36 hours after the administration of Barbitol, compared with the values before Barbitol and with the values 1–3 and 48–96 hours after Barbitol. The increase was statistically significant. The changes are probably caused by an effect of Barbitol on protein metabolism in the liver. The reactions do not appear to be specific for Barbitol.

Die Verabreichung von Barbitol verursacht bei Ratten eine vermehrte Ausscheidung von L-Ascorbinsäure im Harn durch beschleunigte Synthese des Vitamins aus Glucose über D-Glucuronsäure und L-Gulonsäure (1—6). Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen stehen Untersuchungen, bei denen im zellfreien Lebersaft und in Lebermikrosomen Aktivitätserhöhungen der Uridindiphosphatglucose-Dehydrogenase nach Barbitol und der Glucuronosyl-Transferase nach Aminopyrin-Verabreichung gemessen wurden (5, 6). CONNEY und Mitarbeiter führen den Enzym aktivierenden Effekt auf gesteigerte Enzymsynthese durch die genannten Stoffe zurück. Es konnte gezeigt werden, daß nach Phenobarbitalgaben eine signifikante Erhöhung des Leberfeuchtgewichtes, des Gesamt-Leberproteins und des mikrosomalen Leberproteins erfolgt (6—8). Hinsichtlich der Frage der Spezifität der Proteinsynthese-Induktion durch Barbitol wurden Serumprotein-Untersuchungen an Ratten durchgeführt, über die im folgenden berichtet wird. Nach einmaliger Barbitol-Verabreichung wurden Serumprotein-Trennungen im Stärkegel in der Hochspannungselektrophorese mit anschließender quantitativer Auswertung der Fraktionen vorgenommen. Darüber hinaus wurde Gesamtprotein im Serum bestimmt.

Methodik

Für Serumprotein-Trennungen wurden 30 Ratten (Wistar ♀, 200—250 g aus der Tierfarm für Laboratoriumstiere, Göttingen, Jan. 1965) und für Gesamteiweiß-Bestimmungen im Serum 18 Ratten (Wistar ♂, 250 g, Gesellschaft für Versuchstierzucht, Hannover, Mai 1965) verwendet. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit „Altromin“-Rattenfutter und Leitungswasser.

0,2—0,3 ml Blut wurden durch Herzpunktion kurz vor Barbitol-Verabreichung und 1—3 Std. (nach 1, 2, 3 Std. bei je drei Tieren), 6—36 Std. (nach 6, 12, 24, 36 Std. bei je drei Tieren) und 48—96 Std. (nach 48, 72, 96 Std. bei je drei Tieren) nach Barbitalgaben (Intraperitoneal-Injektion von 150 mg/kg Körpergewicht Na-Barbitol) entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut in Kapillarröhrchen aufgezogen, in denen Serum und Blutkuchen durch Zentrifugieren getrennt wurden.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen geschah im Stärkegel (9—15), das aus 10,3 g hydrolysierte Stärke (Fa. Connaught Medical Research Laboratories, Toronto) und 100 ml 0,023M Borsäure/0,0092M NaOH-Puffer pH 8,6 hergestellt wurde. Die Trennung erfolgte bei 900 V, 15—20 mA (bei 10 Trennungsbahnen im Trog nach SMITHIES = 1,5—2,0 mA pro Trennungsbahn) im Hochspannungselektrophorese-Apparat nach WIELAND-PFLEIDERER. Nach 12 Std. waren die Fraktionen auf dem Gelstreifen über 17—18 cm verteilt (Entwicklung mit Amidoschwarz 10 B (Bayer) (16)). Mit einem Schneideapparat wurden die Streifen in etwa 100 je 2 mm dicke Scheibchen zerschnitten. Jedes Scheibchen wurde in 0,5 ml N NaOH gelöst und der Reife nach einer Proteinanalyse mit dem Folin-Reagenz (17, 18) unterzogen.

Der Proteingehalt der Scheibchen (in µg) wurde in ein Diagramm eingetragen, in dem konstant folgende Fraktionen (Nomenklatur nach (19)) gefunden wurden: γ-Globulin, slow-α₂-Globulin, slow-α₁-Globulin, Transferrine (3 dicht zusammenliegende Banden), fast-α₂- und fast-α₁-Globuline (in 2 undeutlich voneinander getrennten Banden), post-Albumin, Albumin, prae-Albumin. Die Wiederfindungsrate für Protein im Gel betrug 96,4%. — Die Bestimmung des Gesamtproteins im Serum erfolgte ebenfalls mit dem Folin-Reagenz (17).

Ergebnisse

Für den quantitativen Vergleich der Proteinfractionen im Serum vor und nach Barbitol-Verabreichung wurden deren Zuwachs- bzw. Abnahmeraten nach Barbitol für jedes einzelne Tier berechnet. Die Untersuchungsergebnisse wurden in drei Gruppen aufgezeichnet: 1. Veränderungen der Proteinfractionen 1—3 Std.; 2. 6—36 Std.; 3. 48—96 Std. nach Barbitol-Verabreichung. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 1 dargestellt.

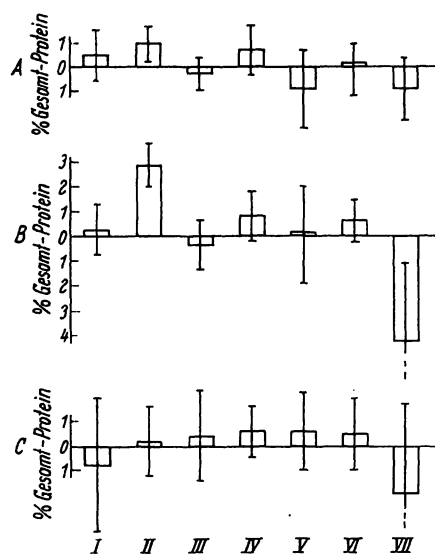


Abb. 1

Zuwachs- bzw. Abnahmeraten der Fraktionen nach Barbitol-Verabreichung (angegeben in % bezogen auf Gesamtprotein im Serum)

I = γ-Globulin, II = slow-α₂-Globulin, III = slow-α₁-Globulin, IV = Transferrine, V = fast-α₂/α₁-Globuline, VI = post-Albumine, VII = Albumin + Prae albumin. A = 1—3 Std., B = 6—36 Std., C = 48—96 Std. nach Barbitol-Verabreichung

gestellt. Es ist zu erkennen, daß 6—36 Std. nach Barbitol die Fraktion des slow-α₂-Globulin erhöht ist. Demgegenüber zeigt die Albuminfraktion eine Erniedrigung, die aber wegen einer großen Standardabweichung statistisch nicht signifikant ist. In den Zeiten vor 6 und nach 36 Std. nach Barbitol-Verabreichung unterscheidet sich das Fraktionsbild nicht signifikant von dem vor der Barbitolinjektion. — Um die Schwankungsbreite der Konzentration in den einzelnen Fraktionen eines unbehandelten Tieres beurteilen zu können, wurde das Serum einer Ratte zur Zeit t₀ nach 24 Std. und nach 48 Std. gewonnen, getrennt und die Zuwachs- bzw. die Abnahmerate gegenüber t₀ berechnet. Die Fraktionsabweichungen waren denen 1—3 Std. und 48—96 Std. nach Barbitol-Verabreichung größtmäßig gleich. In einer weiteren Zusammenstellung ist das Verhalten der Differenzen der slow-α₂-Fraktion nach Barbitol-Verabreichung gegenüber den Werten vor Barbitalgabe für jede Untersuchungszeit aufgezeichnet (Tab. 1). Es ist zu erkennen, daß slow-α₂-Globulin 6, 12, 36 Std. nach Barbitol signifikant erhöht war. — In Tabelle 2 sind Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtproteins im Serum in µg pro 0,05 ml Serum vor und 12, 24, 36 Std. nach Barbitol-Verabreichung eingetragen. Es ist zu erkennen, daß das Gesamtprotein

Tab. 1

Zuwachs- bzw. Abnahmeraten der slow- α_2 -Globulinfraction 1—96 Stdn. nach Barbitol-Verabreichung: I = angegeben in % bezogen auf Serum-Gesamtprotein (s. Abb. 1); II = angegeben in % bezogen auf die slow- α_2 -Fraktion

Stdn. nach Barbitol-Verabreichg.	I	II	$t_{0,05} = 2,776$
1	+ 0,26	+ 1,7	0,675
2	+ 2,16	+ 17,4	1,148
3	+ 1,02	+ 7,0	0,553
6	+ 3,04	+ 28,4	5,222
12	+ 3,10	+ 25,8	3,260
24	+ 0,63	+ 4,8	1,110
36	+ 4,13	+ 35,8	2,879
48	+ 1,15	+ 9,2	0,498
72	— 0,08	— 0,5	0,074
96	— 0,35	— 2,3	0,155

Tab. 2

Messung des Gesamtproteins im Serum vor und nach Barbitol-Verabreichung, angegeben in $\mu\text{g}/0,05 \text{ ml}$ Serum. N = Zahl der untersuchten Tiere

Zeit (Stdn.)	\bar{x}	$\pm s$	N
t_0	39,8	$\pm 1,4$	18
12	38,8	$\pm 2,1$	8
24	40,6	$\pm 2,6$	5
36	39,7	$\pm 2,8$	5

im Serum zu Zeiten, in denen eine Proteinerhöhung des slow- α_2 -Globulins besteht, nicht erhöht ist.

Diskussion

Art, Anzahl und Lokalisation der Proteinbanden nach der elektrophoretischen Trennung der Rattenserum stimmen im wesentlichen mit den Angaben von BEATON und Mitarbeitern (19) und den von MATSUI (20) überein. Im Gegensatz zu den Untersuchungen der genannten Autoren wanderten die γ -Globuline in den vorliegenden Versuchen einheitlich zur Anode. Kathodenwärts von der Auftragstelle wurde kein Protein gefunden. Der Grund dafür wird in der Verwendung der Hochspannung, mit der die Proteine in kürzerer Zeit (geringere Endosmose) getrennt wurden, gesehen. Die Trennung von drei Transferrinbanden erfolgte in so

geringen Abständen, daß sie mit der angewendeten Methode der quantitativen Analyse nicht einzeln erfaßt werden konnten. Ebenso wurden die fast- α_2 - und die fast- α_1 -Globuline als gemeinsame und die Postalbumine als zusammenhängende Fraktion gemessen. Rechnerisch wurden die Albumine und die Präalbumine zu einer Fraktion zusammengezogen.

In Untersuchungen über Enzyminduktion bei Ratten durch Barbitol, über die an anderer Stelle berichtet werden wird (6), waren neben Enzymmessungen am zellfreien Leberhomogenat Gesamtprotein-Messungen an der Leber durchgeführt worden. 12 Stdn. nach Barbitol hatte das Leberprotein pro g Leberfrischgewicht um etwa 24% zugenommen, nach 24 Stdn. betrug der Zuwachs nur noch 9% und nach 48 Stdn. war er wieder auf 26% angestiegen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Proteinanstieg der slow- α_2 -Globulinfraction in der Zeit 6—36 Stdn. nach Barbitol-Verabreichung gemessen. Dabei betrug die Zunahme nach 6 Stdn. 28,4% (bezogen auf das Protein der slow- α_2 -Fraktion vor Barbitol-Verabreichung), nach 12 Stdn. 25,8%, nach 24 Stdn. 4,8% (keine Signifikanz der Zunahme) und nach 36 Stdn. 35,8%. Bei dem Proteinanstieg der slow- α_2 -Fraktion handelt es sich offenbar nicht um eine absolute Zunahme des Serumproteins: die Menge des Gesamtproteins im Serum blieb während dieser Zeit nach Barbitol unverändert. Zur gleichen Zeit wurde eine Abnahme der Albumine bei gleichbleibender Menge der übrigen Fraktionen (außer slow- α_2 -Globulin) gefunden, so daß die Zunahme des makromolekularen slow- α_2 -Globulins auf Kosten des mikromolekularen Proteins der Albumine zu geschehen scheint.

Die Spezifität der Barbitolwirkung auf den Proteinstoffwechsel scheint zumindest hinsichtlich der Veränderungen in der slow- α_2 -Globulinfraction nicht sehr groß zu sein. WEIR (21, 22) fand im Rattenserum Veränderungen der slow- α_2 -Fraktion nach Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff.

Literatur

1. LONGENECKER, H. E., H. H. FRICKE und C. G. KING, J. biol. Chemistry 135, 497 (1940). — 2. BURNS, J. J., C. EVANS und N. TROUSOF, J. biol. Chemistry 227, 785 (1957). — 3. BURNS, J. J., Amer. J. Med. 26, 740 (1959). — 4. BURNS, J. J., A. H. CONNEY, P. G. DAYTON, C. EVANS, G. R. MARTIN und D. TALLER, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 129, 132 (1960). — 5. HOLEMANN, S. und O. TOUSTER, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 62, 338 (1962). — 6. HOLLMANN, S. und J. NEUBAUR, im Druck: Zeitschrift für Physiologische Chemie (1967). — 7. CONNEY, A. H., C. DARVISON, R. GASTEL und J. J. BURNS, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 130, 1 (1960). — 8. REMMER, H., Ciba Found. Sympos., Enzymes and Drug Action, S. 276 (1962). — 9. SMITHIES, O., Nature (London) 175, 307 (1955). — 10. SMITHIES, O. und M. D. POULIK, Nature (London) 177, 1033 (1956). — 11. SMITHIES, O., Advanc. Protein Chem. 65, 14 (1959). — 12. SMITHIES, O. und O. HILLER, Biochem. J. 72, 121 (1959). — 13. SMITHIES, O., Biochem. J. 71, 585 (1959). — 14. AMBS, E., Med. Welt 17, 897 (1960). — 15. SCHEURLIN, P. G., Verh. Dtsch. Gesinn. Med. 66, 586 (1960). — 16. GRASSMANN, W., K. HANNIG und M. KNEBEL, Dtsch. med. Wschr. 76, 333 (1951). — 17. LOWRY, O. H., N. J. ROXBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951). — 18. FOLIN, O. und V. CIOCALTEU, J. biol. Chemistry 73, 627 (1927). — 19. BEATON, G. H., A. E. SELLEY und A. M. WRIGHT, J. biol. Chemistry 236, 2001 (1961). — 20. MATSUI, K., Analyt. Biochem. 6, 491 (1963). — 21. WEIR, D. M., Nature (London) 202, 307 (1964). — 22. HEIM, W. G. und J. M. KERRIGAN, Nature (London) 199, 1100 (1963).

Dr. med. J. Neubaur
34 Göttingen, Humboldtallee 1